Aus dem Hygienischen Institut der Universität Rostock.

BEITRÄGE

zur

Kenntnis der quantitativen Zersetzung des Milchzuckers durch den Bacillus acidi lactici.

Inaugural-Dissertation

der

hohen philosophischen Fakultät der Universität Rostock

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Paul Haacke

aus Schwerin (Mecklenburg).

München.

Druck von R. Oldenbourg.

1901.

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Rostock.

BEITRÄGE

zur

Kenntnis der quantitativen Zersetzung des Milchzuckers durch den Bacillus acidi lactici.

Inaugural-Dissertation

der

hohen philosophischen Fakultät der Universität Rostock

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Paul Haacke

aus Schwerin (Mecklenburg).

München.

Druck von R. Oldenbourg.

1901.

Referenten:

Prof. Dr. FALKENBERG.

Prof. Dr. MICHAELIS.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Rostock.)

Nachdem durch die Untersuchungen von Burchard[1]) über den Ablauf und die Gröfse der durch den Micrococcus ureae liquefaciens bewirkten Harnstoffzersetzung dargethan ist, welche aufserordentlichen Stoffzersetzungen in der Bakterienzelle stattfinden können, erschien es wünschenswert, zu erfahren, welcher Kraftwechsel diesen Stoffzersetzungen entspricht.

Ich habe es auf Veranlassung des Herrn Professors Pfeiffer unternehmen wollen, Versuche nach dieser Richtung hin auszuführen. Der Micrococcus ureae liquefaciens erschien für diese Versuche nicht recht geeignet; denn, wenn auch durch die Untersuchungen von Rubner die Verbrennungs- und Lösungswärme des Harnstoffs genau bekannt ist, so schienen doch die Werte für das bei der Spaltung des Harnstoffs entstehende Ammoniumkarbonat nicht genau genug ermittelt zu sein. Sie genau zu ermitteln, war mir bei dem Mangel eines Kalorimeters nicht möglich, ganz abgesehen davon, dafs es durchaus nicht sicher feststeht, ob überhaupt bei der Zersetzung des Harnstoffs nur Ammoniumkarbonat und nicht auch Karbamat gebildet wird.

Hingegen erschien es verhältnismäfsig leicht, die Frage nach dem Kraftwechsel in den Bakterienzellen durch Untersuchungen

1) Burchard, Archiv f. Hygiene, 1899, Bd. 36, S. 264.

über die Zersetzung des Milchzuckers durch Milchsäurebakterien zu lösen, da die in Betracht kommenden kalorischen Werte des Milchzuckers und der Milchsäure genau bekannt sind und angenommen werden durfte, dafs im wesentlichen aus einem Molekül Milchzucker vier Moleküle Milchsäure gebildet werden.

Leider hat sich jedoch im Verlauf der Untersuchungen herausgestellt, dafs der von mir zu den Versuchen benutzte Milchsäurebildner lange nicht so viel Säure aus dem Milchzucker abspaltete, als erwartet werden konnte. Ja, es erschien mir sogar aus einigen Versuchsergebnissen hervorzugehen, dafs der betreffenden Mikroorganismus die gebildete Milchsäure weiter zerstörte, und ich mufste mich deshalb entschliefsen, auf die Lösung der oben erwähnten Frage zu verzichten, um so mehr, als sich ergab, dafs neben Milchsäure ganz erhebliche Mengen von Kohlensäure, Essigsäure und Alkohol gebildet wurden, und eine genaue quantitative Bestimmung dieser Stoffwechselprodukte zu grofse Schwierigkeiten verursachte.

Ich habe mich daher darauf beschränkt, nur die quantitative Zersetzung des Milchzuckers zu verfolgen, hoffe aber durch meine Untersuchungen einen weiteren Beitrag zur Kenntnis der quantitativen Stoffzersetzung in der Bakterienzelle zu geben.

Was die bisherigen Kenntnisse über die Zersetzung des Milchzuckers, bezw. der Zuckerarten überhaupt, durch Milchsäurebakterien anlangt, so beziehen sich dieselben wesentlich auf die qualitative Feststellung der Bildung von Milchsäure allgemein und der verschiedenen stereoisomeren Formen derselben im einzelnen.

Als Erster hat jedenfalls Pasteur[1]) die Beobachtung gemacht, dafs die Milchsäuregärung der Milch durch Mikroorganismen hervorgerufen wird. Seitdem ist es der fortschreitenden Wissenschaft im Laufe der Jahre gelungen, eine grofse Anzahl von Bakterien aufzufinden, die aus Milchzucker, Traubenzucker

1) Pasteur, Annal. de Chimie et de Physique, (3), 52. — Compt. rend. de l'Académie des sciences, 52.

und anderen Zuckerarten Milchsäure bilden. Hueppe[1]) bezeichnete den von ihm nachgewiesenen und genauer studierten Bacillus acidi lactici als den speziellen bezw. Haupt-Erreger der Milchsäuregärung. Lange Zeit hat diese Ansicht Hueppes ohne Widerspruch bestanden, bis später Milchsäurebakterien aufgefunden wurden, welche dem Hueppeschen Bacillus den Rang streitig machten. Aber nicht nur bei solchen echten Milchsäurebakterien, sondern auch bei den verschiedensten anderen Spaltpilzen wurde später die Eigenschaft entdeckt, neben anderen Stoffwechselprodukten Milchsäure zu produzieren.

Hieraus ging dann zunächst auch eine Einteilung der Milchsäurebakterien in spezifische und fakultative hervor, bis Weigmann[2]) im Jahre 1899 eine neue Einteilung derselben nach dem Wachstum auf künstlichen Nährböden und dem physiologischen Verhalten (Produktion von Gasen etc.) gab. Sein Schüler Mac Donnell[3]) untersuchte, nachdem schon von verschiedenen Seiten die Vermutung aufgestellt war, dafs die verschiedenen als Milchsäurebakterien beschriebenen Bakterien nur Varietäten einiger weniger Arten seien[4]), eingehend möglichst viele Milchsäurebakterien auf ihre nähere Verwandtschaft. Er kam zu dem Resultate, dafs man nur zwei Bakterienarten als Ausgangsformen für die übrigen anzunehmen brauche. Er fand bei seinen Versuchen, dafs die Stäbchenbakterien je nach der Kultur auf verschiedenen Nährböden in ihrer äufseren Gestalt stark variierten. Er nahm deshalb keinen Anstand, ovale Coccen in die Klasse des Bakteriums zu stellen, da eine strenge Scheidung oft sehr schwer sei.[5]) Aufserdem teilte er die Varietäten (Rassen) nach dem Geschmack ein, den sie beim Wachstum in der Milch derselben erteilten, eine Einteilung, die offenbar mehr den spezifischen Molkereiinteressen als denen der Wissenschaft dient. Jedenfalls scheint

1) Hüppe, Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 2.

2) Weigmann, Versuch einer Einteilung der Milchsäurebakterien des Molkereigewerbes. Centralbl. f. Bakter. u. Parasitenkunde, 1899, II. Abteil., Bd. V, S. 861 u. ff.

3) Mac Donnell, Über Milchsäurebakterien. Dissertation, Kiel, 1899.

4) Vgl. Esten, XII., Bacillus acidi lact., Stons agricultur. Exp. Station.

5) Vgl. Weigmann, (a. a. O.), S. 860; Mac Donnell, S. 30.

mir damit nicht bewiesen zu sein, dafs es nicht noch mehr Arten von Milchsäurebakterien gibt, zumal von verschiedenen Forschern festgestellt worden ist, dafs verschiedene Bakterienarten verschiedene Milchsäure bilden. Man müfste nach Mac Donnell schon an eine Pleomorphie der Milchsäurebakterien denken, die Flügge[1]) ganz entschieden leugnet.

Auf die Untersuchung der Art der gebildeten Milchsäure, auf welche seit Schardingers Entdeckung in neueren Arbeiten stets Rücksicht genommen ist, scheint Mac Donnell nicht eingegangen zu sein. Purdie und Walter[2]) folgern ja allerdings aus der Thatsache, dafs inaktive Milchsäure ein Gemisch von Rechts- und Linksmilchsäure ist, dafs eine sonst inaktive Säure produzierender Bacillus unter gewissen Bedingungen nur eine Art Säure (dann optisch aktive) produzieren könne. Es ist dies eine Ansicht, die Kozai[3]) durch seine Versuche zu erhärten sucht, der aber Günther und Thierfelder[4]) sich nicht anschliefsen können.

Auf die Frage über die Bildung verschiedener Milchsäuren einzugehen, hat für den vorliegenden Zweck keine Bedeutung.

Eine Feststellung der Quantität der von Milchsäurebakterien gebildeten Milchsäure ist nur von Wenigen versucht worden. Aderhold[5]) gibt an, dafs bei seinen Versuchen Bacterium coli 0,241—0,576 % Säure, Bakterium Güntheri 0,546—1,287 % (auf Milchsäure berechnet) gebildet habe. Conrad[6]) fand, dafs durch sein Bakterium brassicae acidae pro 100 ccm Kulturflüssigkeit eine 4 ccm $^1/_1$N-Natronlauge entsprechende Menge Säure gebildet wurde (= 0,36 % Milchsäure). Aus seinen Angaben hebe ich nachstehende tabellarische Zusammenstellung über die Milchsäureproduktion des von ihm geprüften Milchsäurebildners (Bact. brass. acid.) hervor.

1) Vgl. Flügge, Die Mikroorganismen, 1896, Bd. II, S. 80.
2) Purdie und Walter, Chem. Centralblatt, 1892, II, S. 352.
3) Kozai, Zeitschrift f. Hygiene, 1899, Bd. 31, S. 337.
4) Günther und Thierfelder, Hygien. Rundschau, X, Heft 16.
5) Aderhold, Über Einsäuern von Früchten etc. Centralbl. f. Bakt. etc., II, Bd. V, S. 511.
6) Conrad, Sauerkrautgärung. Archiv f. Hygiene, Bd. 29, S. 72.

Zeit	Milchsäure	
	aërob bei 22°	aërob bei 37°
Nach 12 Stunden	0,045 g	0,090 g
Am 1. Tage	0,099 »	0,216 »
» 3. »	0,225 »	0,477 »
» 6. »	0,405 »	0,585 »
» 9. »	0,522 »	0,621 »
» 12. »	0,576 »	0,639 »
» 17. »	0,630 »	0,639 »
» 22. »	0,648 »	0,639 »

Lehmann und Neumann[1]) führen an, dafs Bacillus acidi lactici Hueppe in 5 Tagen in 100 ccm 2% Traubenzuckerbouillon eine 4,6 ccm Normalalkali entsprechende Menge Säure erzeugt. (= 0,41% Milchsäure).

Diese Angaben beziehen sich meist auf die Menge Säure, die am Ende einer bestimmten Versuchsperiode festgestellt wurde; selten ist die Zunahme der Säure (Conrad), nie die Abnahme des säureliefernden Zuckers, sowie die Zahl der hieran beteiligten Bakterien berücksichtigt worden.

Soweit die Angaben aus der mir zugänglich gewesenen Litteratur über die früheren Versuche zur Ermittelung der Milchsäureproduktion der Milchsäurebildner.

Zur Beschreibung meiner eigenen Versuche übergehend, gebe ich zunächst eine Schilderung der zu den Versuchen verwendeten Bakterienart.

Dieselbe wurde aus Rostocker Marktmilch, in der sie sich regelmäfsig und, wie es scheint, vorherrschend findet, mit Hilfe einer durch Lackmus gefärbten Peptonmolkengelatine isoliert. Das Bakterium stellte ein Kurzstäbchen mit abgerundeten Enden dar. Seine Länge war je nach dem Kulturmedium bis 3 μ, seine Dicke 0,3—0,5 μ, Eigenbewegung fehlte ihm.

Auf Gelatineplatten bildete es anfangs kleine runde glattrandige Kolonien ohne Zeichnung, die sich allmählich gleich-

1) Lehmann und Neumann, Kurzes Lehrbuch der Bakteriologie, 1900, Bd. II.

mäfsig vergröfserten und nach dreiwöchigem Wachstum über 1 mm im Durchmesser haltende Kugeln darstellten. Die oberflächlichen Kolonien bildeten allmählich ziemlich hohe Kegel. Die Farbe der Kolonien war weifs bis schwach gelblich, ihre Oberfläche saftig glänzend. In Strichkulturen bildete der Bacillus schmale, wellige, schleimige Rasen. Im Gelatinestich fand reichliches Wachstum längs des ganzen Impfstiches statt, an der Oberfläche bildete sich ein Nagelkopf. In Traubenzuckergelatine erfolgte gleiches Wachstum, jedoch unter lebhafter Gasbildung. Eine Verflüssigung der Gelatine wurde niemals beobachtet.

Auf gewöhnlichem Peptonagar war das Wachstum ähnlich und ebenfalls sehr lebhaft, namentlich an der Oberfläche, die vom Rasen oft ganz überzogen wurde. Auf Zuckeragar wuchs der Bacillus unter reichlicher Gasentwicklung.

Kartoffel erwies sich als ein ganz besonders gutes Nährsubstrat. Hier war schon nach 6 Stunden bei 17,5° C. deutlich Wachstum zu unterscheiden. Die anfangs fast weifse Auflagerung nahm nach einiger Zeit bräunliche Farbe an und zeigte ein schleimiges, feuchtes Aussehen. Die Oberfläche der Kultur war oft durch Gasblasen kraterförmig zerrissen.

In Traubenzuckerbouillon erfolgte ebenfalls rasches Wachstum. Schon nach 6 Stunden war eine leichte Trübung bemerkbar; nach weiteren 6 Stunden fand sich ein reichlicher Bodensatz. Beim Umschütteln entwichen zahlreiche kleine Gasblasen.

In Milch fand nach drei Tagen bei 37° C. regelmäfsig Coagulation statt unter Säuerung, Gasbildung und Abscheidung eines trüben Serums. Die Gasbildung war am lebhaftesten vor der Coagulation. Der Geschmack der Milch war schwach sauer, die Säuremenge betrug 0,46%, auf Milchsäure berechnet (= 5,09 ccm $^1/_1$ N-Natronlauge). Die etwa durch das Caseïn gebundene Säuremenge ist hierbei nicht mit in Rechnung gebracht[1]). Die Milchsäure war inaktive Milchsäure.

1) Timpe (Archiv f. Hygiene, 18, 1) und Kabrhel (Zeitschrift f. Hygiene u. Infekt.-Krankh., 19, 392) haben gefunden, dafs in Milch stets mehr Milchsäure nachzuweisen ist als in anderen Zuckerlösungen, da ein Teil der Milchsäure durch Caseïn chemisch gebunden wird.

Als besondere Eigentümlichkeiten des Stoffwechsels meines Milchsäurebacillus habe ich noch zu erwähnen: die Schwefelwasserstoffbildung in Bouillonkulturen bei 37°, sowie die Bildung von Essigsäure, Alkohol und Kohlensäure neben der Milchsäure.

Sporenbildung konnte nicht beobachtet werden.

Die Färbung des Bacillus ging sehr leicht, auch nach Gram, vor sich.

Aus vorliegenden Angaben über das morphologische und biologische Verhalten meines Milchsäurebacillus erhellt, dafs der Bacillus mit dem Bacillus acidi lactici Hueppe identisch ist.[1]) Er unterscheidet sich von jenem allerdings durch Häutchenbildung in Bouillon, Fehlen der Indolbildung, sowie den Mangel an Sporen. Doch sind die ersteren Abweichungen nicht von solcher Bedeutung, um aus ihnen auf eine neue Art Milchsäurebacillen schliefsen zu können, und was die letztere Eigenschaft betrifft, so sind die Angaben über das Sporenbildungsvermögen des Hueppeschen Bacillus in der Litteratur so widersprechend, dafs es höchst zweifelhaft ist, ob der Sporenbefund Hueppes zu Recht besteht.

Versuchsanordnung.

Die Versuche wurden in folgender Weise angestellt: ein 500 ccm fassender, mit doppelt durchbohrtem Stopfen verschlossener Erlenmeyer-Kolben wurde mit einem langen, schräg abwärts gebogenen Ausflufsrohr und einem kurzen, geraden, weiten Einfüllrohr montiert. Beide Röhren wurden mit Wattepfropfen verschlossen, sodann wurde der Kolben mit 200 ccm 1proz. Peptonmolke beschickt und zweimal je eine Stunde im Dampftopf bei 100° sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde der Kolbeninhalt mit einer möglichst frischen Bouillonkultur des Bacillus acidi lactici geimpft, die mittels einer Kapillare durch das Einfüllrohr eingebracht wurde. Nach kräftigem Umschütteln wurde eine Probe der Flüssigkeit von etwa 25 ccm

1) Weigmann (a. a. O.) schreibt dem Bacillus acid. lact. Hueppe Rechtsmilchsäure zu.

ausgeblasen, die Ausflufsröhre sofort wieder sterilisiert und verschlossen. Der Kolben wurde im Brutschrank bei 37° C. gehalten, und in Intervallen von je drei Tagen je eine Probe in gleicher Weise ausgeblasen.

Von der Probe wurden sofort Verdünnungen in der gleich zu beschreibenden Weise angefertigt, und mit kleinen Mengen letzterer Gelatineplatten beschickt. Meist wurden drei Verdünnungen hergestellt, die Höhe der Verdünnung schwankte zwischen 0,05 und 1,0 ccm der Originalprobe bezw. der ersten Verdünnung auf je 100 ccm sterilen Wassers. Nach jeder Verdünnung wurde gründlich durchgeschüttelt, mit steriler Pipette die Aussaatprobe entnommen (0,05 — 1,0 ccm) und direkt in die Petrische Schale übergeführt, in der dann durch Hin- und Herbewegen die Mischung mit der verflüssigten Traubenzucker-Gelatine bewerkstelligt wurde.

Die Schalen blieben bei Zimmertemperatur (18—20°) so lange stehen, bis auch die kleinsten Kolonien gut zu erkennen waren. Dann wurden sie in der üblichen Weise ausgezählt. Die Auszählung wurde an mehreren Tagen wiederholt, um Gewähr zu erhalten, dafs kleinere Kolonien anfangs nicht doch übersehen worden waren.

Bei Berechnung der Resultate der Zählung wurde auf die Dichte der Platten Rücksicht genommen. War etwa Platte I nicht zählbar, so dienten Platte II und III zur Ermittelung der Keimzahl. Anderseits wäre es ein Fehler gewesen, Platte III zu verwenden, wenn die ersten beiden brauchbar waren. Als Beispiel möge eine Zählung aus Versuch IX dienen. Aussaat je 1 ccm.

Verdünnung:

1,0 ccm Originalkultur + 100 ccm Wasser = I. Verdünnung.
1,0 » der I. Verdünnung + 100 » » = II. »
1,0 » » II. » + 100 » » = III. »

Platte I, gezählt 992 Kolonien:

1,0 ccm der I. Verdünnung enthielt 992 Keime
folglich 101,0 » » I. »
oder 1,0 » » Originalkultur » } 100 192 » .

Platte II, gezählt 10 Kolonien:

	1,0 ccm	der II.	Verdünnung	enthielt	10 Keime
also	101,0 »	» II.	»	»	1010 »
oder	1,0 »	» I.	»	»	
folglich	101,0 »	» I.	»	»	102 010 » .
oder	1,0 »	» Originalkultur		»	

Platte III, gezählt 1 Kolonie:

1,0 ccm der III. Verdünnung enthielt somit 1 Keim.

Da sich nun Verdünnung I zu Verdünnung II etwa wie 1 : 100 verhält, so müfste 1,0 ccm der Verdünnung III 0,1 Keim enthalten, oder es entfiele erst auf die zehnte Platte ein Keim. Es ist also klar, dafs Platte III bei der Zählung nicht berücksichtigt werden darf. Der Durchschnitt ist also nur aus Platte I und Platte II zu berechnen:

Platte I = 100 192 Keime 1 ccm Originalkultur
» II = 102 010 » 1 » »

Mittel: 101 101 Keime für 1 ccm der Originalkultur.

Die Bestimmung des Milchzuckergehaltes der ausgeblasenen Probe wurde nach dem Soxhletschen Verfahren ausgeführt:

50 ccm Fehlingscher Lösung wurden mit 5 event. 10 ccm (je nach der Konzentration) der filtrierten Kulturflüssigkeit und mit etwa 100 ccm Wasser 6 Minuten im Sieden erhalten. Das ausgeschiedene Kupferoxydul wurde in der Allihnschen Röhre gesammelt, als Oxyd gewogen und nach den Weinschen Tabellen auf Milchzucker umgerechnet.

Die Säurebestimmung wurde in den Versuchen I und II so ausgeführt, dafs 5 ccm der Kulturflüssigkeit direkt nach Zusatz von Lackmustinktur mit $^1/_{10}$ N-Natronlauge titriert wurden. Dann wurde mit Schwefelsäure angesäuert, ausgeäthert und die ätherische Lösung auf dem Wasserbade abgedampft. Der mit Wasser aufgenommene Rückstand wurde abermals titriert und als Milchsäure in Rechnung gebracht.

Teilweise wurde bei den übrigen Versuchen auch folgendes Verfahren eingeschlagen: 5 ccm der gut umgeschüttelten Kulturflüssigkeit wurden mit verdünnter Schwefelsäure versetzt; der

gebildete Gips wurde abfiltriert, worauf ausgeäthert wurde. Der nach dem Verdunsten des Äthers bleibende Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und titriert.

Eine andere Methode kam daneben zur Anwendung: 5 ccm der umgeschüttelten Kulturflüssigkeit wurden mit Ammoniumkarbonatlösung erhitzt, der kohlensaure Kalk wurde abfiltriert, das milchsaure Ammoniak mit Schwefelsäure zersetzt, die freie Milchsäure ausgeäthert, der Äther verdunstet und der Rückstand wie oben titriert.

Den chemischen Nachweis der Milchsäure habe ich zum Schlufs des Versuchs in folgender Weise[1]) geführt:

Das in der Kulturflüssigkeit suspendierte Gemenge von kohlensaurem und schwer löslichem milchsauren Kalk wurde abfiltriert und mit Ammoniumkarbonat gekocht, um die Milchsäure als Ammoniumverbindung zu erhalten. Die Lösung derselben wurde mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt und mit Äther extrahiert. Dann wurde die ätherische Lösung verdampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, etwa vorhandene Schwefelsäure (stets nur ganz geringe Spuren) durch Bleiessig als schwefelsaures Blei entfernt, mit mehr Bleiessig versetzt und so lange alkoholisches Ammoniak hinzugefügt, als noch eine Fällung von basischem milchsauren Blei entstand. Das Salz wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, und die Lösung der Milchsäure polarisiert.

Obwohl Kruse[2]) für den Bacillus acidi lactici Hueppe als Nebenprodukte des Stoffwechsels nur Kohlensäure und Alkohol angibt, so war es doch, wie schon erwähnt, kaum zweifelhaft, dafs noch andere Körper als jene durch die Lebensthätigkeit des Bakteriums erzeugt würden, besonders da schon Luboldt[3]) als Umsetzungsprodukte des Milchzuckers bei der Milchsäuregärung Milchsäure, Alkohol, Kohlensäure und Essigsäure angibt und Konrad bei dem Bacterium brassic. acid. verschiedene Gase und Säuren nachgewiesen hat.

1) Palm, Zeitschrift f. analyt. Chemie 22, S. 223; 26, S. 34.

2) Kruse bei Flügge, Die Mikroorganismen, Bd. II, S. 356.

3) Luboldt, Über die Gärung des Milchzuckers. Journal f. prakt. Chemie, 1859, Bd. 67, S. 282.

Ich habe den Nachweis etwaiger Nebenprodukte in den Kulturen meines Milchsäurebildners nach der bei Conrad angegebenen Methode[1]) ausgeführt:

Nach Abschluſs der Milchsäuregärung wurde die Kulturflüssigkeit der Destillation unterworfen, und das Destillat auf flüchtige Stoffe untersucht. In Betracht konnten kommen: Alkohol, Aldehyd und Aceton.

Zur Prüfung auf Alkohol wurde im Destillat die Jodoformreaktion mit Erfolg angewandt.

Ein anderer Teil des Destillates wurde zum Nachweis von Aldehyd mit saurem schwefligsauren Natron behandelt: Aldehyd war nicht nachweisbar.

Zur Ermittelung von Aceton[2]) wurde ein Teil des Destillates mit Sublimatlösung versetzt, der mit alkoholischer Kalilauge alkalische Reaktion erteilt war. Nach kräftigem Umschütteln wurde filtriert. Das Filtrat wurde mit Schwefelammonium überschichtet, Schwarzfärbung blieb aus: Aceton war nicht vorhanden.

Der Rückstand der Kulturflüssigkeit wurde auf den dritten Teil eingedampft, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf 6 bis 8 Stunden destilliert. Trotz der langen Dauer der Destillation gelang es nicht, die flüchtigen Säuren vollkommen überzutreiben (vgl. Conrad). Das Destillat wurde mit Barytwasser neutralisiert, die Lösung der Barytsalze fast bis zur Trockne verdampft und die Salzmasse mit konzentrierter Phosphorsäure versetzt. Die sich abscheidende wässerige Schicht hätte die Säuren der Ameisensäurereihe bis zur Buttersäure enthalten müssen.

Ameisensäure nachzuweisen, wurde mit Silbernitrat und Quecksilberchlorid vergeblich versucht.

Essigsäure wurde durch die Bildung von Essigsäureäthylester erkannt.

Der Destillationsrückstand wurde mit Äther ausgeschüttelt; er enthielt reine Milchsäure, die in das Zinksalz übergeführt wurde, dessen Lösung die Polarisationsebene nicht drehte.

1) Conrad, Archiv f. Hygiene, Bd. 29, S. 72 u. ff.

2) Hoppe-Seyler, Handbuch d. physiol. Chemie, 6. Aufl., 1893.

Als Stoffwechselprodukte wurden bei meinen Versuchen also Milchsäure, Essigsäure und Alkohol festgestellt. Die Natur der reichlich gebildeten Gase konnte mangels gasanalytischer Apparate im einzelnen nicht ermittelt werden. Jedoch wurde das Vorhandensein von viel Kohlensäure unter denselben konstatiert.

Berechnet wurden Milchzucker und Milchsäure auf 100 ccm Kulturflüssigkeit. Die Prozentzahlen dürfen den absoluten wohl gleich geachtet werden, da eine Verdunstung der Kulturflüssigkeit während des Versuches so gut wie ausgeschlossen erschien.

Obwohl mir die Thatsache bekannt ist, dafs freie Milchsäure das Wachstum der Milchsäure produzierenden Bakterien empfindlich schädigt und schliefslich gänzlich hemmt, eine Thatsache, der man in der Industrie durch Zusatz eines Neutralisierungsmittels zu den Kulturmedien Rechnung trägt, so erschien es doch nicht uninteressant, die Milchzuckerzersetzung auch für diese Fälle kennen zu lernen, in welchen die gebildete Milchsäure in der Kulturflüssigkeit frei verblieb. Die beiden ersten Versuche wurden deshalb ohne Zusatz einer säurebindenden Substanz zur Kulturflüssigkeit ausgeführt.

I. Versuch.

200 ccm 1 proz. Peptonmolke ohne Neutralisierungsmittel, mit einer frischen Traubenzuckerbouillonkultur von Bacillus acidi lactici Hueppe beschickt.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme d. Milchzuckers in %	Säure in %		Keime pro 1 ccm
			flüchtige (als Essigsäure berechnet)	nicht flücht. (als Milchsäure berechnet)	
Nach d. Beschickung	3,554	—	—	—	20 025
» 72 Stunden	3,238	0,270	0,072	0,061	46 918 452 913
» 144 »	3,284	—	0,100	0,074	51 346 295
» 216 »	3,134	0,150	0,067	0,038	10 110 100
288 »	3,120	0,014	0,037	0,148	10 010

II. Versuch.

wurde in derselben Weise wie Versuch I ausgeführt.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme d. Milchzuckers in %	Säure in %		Keime pro 1 ccm
			flüchtige (als Essigsäure berechnet)	nichtflücht. (als Milchsäure berechnet)	
Nach d. Beschickung	3,538	—	—	—	—
» 72 Stunden	3,180	0,358	0,06	0,061	209 963 755
» 144 »	3,180	0	?	?	148 903 755
» 216 »	3,150	0,030	0,073	0,112	10 020 010
» 288 »	3,120	0,030	0,108	0,018	steril

Wie zu erwarten war, setzte die auftretende Säure der Vermehrung der Bakterien ein baldiges Ziel. Obwohl noch eine grofse Menge Milchzucker vorhanden war, vermochten die Bakterien nicht denselben aufzuzehren.

In beiden Versuchen fand die stärkste Vermehrung der Bakterien innerhalb dreier Tage statt. Die Zahl der Keime nahm dann wieder ab, bis nach 12 Tagen die Abnahme so bedeutend war, dafs die Platten steril oder fast steril blieben.

Die Zersetzung des Milchzuckers erhellt aus folgender Tabelle:

Versuch	Milchzuckerzersetzung in %			
	nach 72 h	144 h	216 h	288 h
I	8,9	7,6 (?)	11,8	12,2
II	10,1	10,1	10,9	11,8

Offenbar wurden die Bakterien in ihrer Lebensthätigkeit durch die von ihnen produzierte Säure geschädigt, ja vielleicht zum Teil sogar getötet. Ich schliefse auf letzteres daraus, dafs die Platten zuletzt steril waren. Wären die Bakterien nur in ihrer Entwicklung gehemmt gewesen, so hätten sie sich auf dem frischen Nährboden rasch wieder vermehren müssen. Eine Rechtfertigung dieses Schlusses, dafs sie getötet wurden, erblicke ich in den

Erfahrungen beim Versuch V, bei welchem die Säure durch im Überschufs vorhandenes Calciumkarbonat jeweils sofort gebunden wurde. Hier blieb die Kulturflüssigkeit, nachdem mit dem Verschwinden des Milchzuckers und der Abnahme der Keime der Versuch abgebrochen war, vom 10. August bis zum 30. Oktober stehen. Beim Anfertigen einer Platte mit 0,1 ccm der Kulturflüssigkeit zeigten sich sehr zahlreiche Kolonien. Die Bakterien hatten hier wegen Mangels an Nahrung einen gewissen Ruhezustand erreicht, um aber bei Darbietung eines guten Nährbodens sich sofort wieder rasch zu vermehren.

Es lag der Gedanke nicht fern, dafs bei den Bakterien während dieses Ruhestadiums Sporulation aufgetreten sei. Ich konnte jedoch keine Sporen nachweisen. Würde mein Bacillus solche bilden, so hätte er dies doch in den Fällen sicher thun müssen, wo er, wie z. B. bei Versuch XI, offenbar zuerst die günstigsten Lebensbedingungen hatte, aber allmählich die Erschöpfung des Nährmaterials drohte. Aber auch in diesem Falle fand ich nichts, was als Sporen hätte angesprochen werden können. Ebenso wenig aber auch, als ich die Versuche Hueppes wiederholte. Hueppe sagt über seinen Sporenbefund[1]):

». . . habe ich mich von der Sporenbildung überzeugt. In der Milch und in der Gelatine hatte ich wohl schon Formen beobachtet, welche Sporen zu sein schienen, konnte mich aber nicht bestimmt dafür aussprechen. Sicher gelang mir dies in den verschiedensten Zuckerlösungen. Hier beobachtete ich endständig an den kleinen Zellen das Auftreten eines kugeligen, glänzenden, stark lichtbrechenden Körperchens.«

In eine sterile Traubenzuckerlösung brachte ich eine möglichst grofse Menge von Bakterien und kultivierte 14 Tage bei gewöhnlicher Temperatur. Bei der mikroskopischen Untersuchung ergab sich, dafs keine Sporen gebildet waren, wohl aber eine starke Involution der Bakterien stattgefunden hatte, welche so tiefgreifend war, dafs selbst Aussaat in Traubenzuckergelatine, also Zufuhr guter Nährstoffe, nicht mehr regenerierend wirkte.

1) Hueppe, Mitteil. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, 2, S. 339—340.

Ich bestätige damit übrigens den Befund Mac Donnells, der fand, dafs Milchsäurebakterien nicht in reinen Milchzuckerlösungen wachsen, auch für Traubenzuckerlösungen.

Die Beobachtung von der Abnahme der Keime in den Kulturen nach einer gewissen Zeit bei gleichzeitigem Unvermögen derselben, selbst auf guten Nährböden (Gelatineplatten) wieder zu wachsen und Kolonien zu bilden, stimmt aufserordentlich gut mit den Beobachtungen Burchards überein, der ähnliche Ruhezustände bei dem Micrococcus ureae liquefaciens fand.

Bei den folgenden Versuchen III-VIII wurde zu den Kulturflüssigkeiten gefälltes Calciumkarbonat zur Bindung der gebildeten Milchsäure hinzugefügt. Damit waren ähnliche Bedingungen geschaffen, wie sie in der Industrie zur Herstellung von technischer Milchsäure dienen.

III. Versuch.

200 ccm 1 proz. Peptonmolke mit reichlichem Calciumkarbonatzusatz, mit einer frischen Traubenzuckerbouillonkultur von Bacillus acid. lact. Hueppe beschickt.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kulturflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,402	—	—	10 010
» 72 Stunden	2,162	1,240	0,018	300 600 300
» 144 »	0,860	1,302	0,130	?
216 »	0,560	0,300	0,203	?
288 »	Spuren	0,560	0,180	918 278 910
» 360 »	—	—	0,198	725 302 520

IV. Versuch.

Anordnung dieselbe wie beim III. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure in g pro 100 ccm Kulturflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,402	—	—	10 010
» 72 Stunden	2,404	0,998	0,056	40 080 040
» 144 »	2,060	0,364	0,168	?
» 216 »	1,320	0,740	0,320	?
» 288 »	0,440	0,880	0,260	2 082 080 520
» 360 »	Spuren	0,440	0,279	493 906 630

Beide Versuche zeigen sehr deutlich den günstigen Einfluſs, der ausgeübt wird, wenn die gebildete Säure sofort gebunden wird. Die Abnahme des Milchzuckers, die sich bei den beiden ersten Versuchen in sehr bescheidenen Grenzen hielt, geht hier rapide vor sich. Während dort der Milchzuckergehalt der Kulturflüssigkeit insgesamt sich nur um 0,43 resp. 0,42 % verminderte, ist hier bei Versuch IV fast die ganze Menge des Milchzuckers nach 360 Stunden, bei Versuch III schon nach 288 Stunden aufgezehrt.

Dasselbe Ergebnis lieferten die zur Kontrolle dieser Versuche angestellten folgenden Versuche (V—VIII), deren Anordnung vollständig die gleiche war wie die der Versuche III und IV; nur kamen bei Versuch VII und VIII 500 ccm Peptonmolke zur Verwendung.

V. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kulturflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,120	—	—	80 040
» 72 Stunden	1,418	1,702	0,130	?
144 »	0,768	0,650	0,315	939 129 330
» 216 »	0,172	0,596	0,556	540 810 270

VI. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kulturflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,194	—	—	200 100
» 72 Stunden	1,388	1,806	0,112	2 649 203 440
» 144 »	0,761	0,627	0,185	1 389 934 620
» 216 »	0,112	0,649	1,008	1 121 120 280

VII. Versuch.

500 ccm 1 proz. Peptonmolke.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kulturflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,164	—	—	200 100
» 72 Stunden	1,694	1,470	0,018	2 283 280 280
» 144 »	0,976	0,718	0,083	1 681 680 420
» 216 »	0,753	0,223	0,407	945 552 540
» 288 »	0,162	0,591	0,065	189 274 590
» 360 »	—	0,162	0,243	350 700 350

VIII. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kulturflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,314	—	—	1 001
» 72 Stunden	2,892	0,422	0,018	51 005
144 »	0,858	2,034	0,074	9 231 905
216 »	0,805	0,053	0,056	2 274 823
» 288 »	0,449	0,356	0,074	5 151 505

Die Versuchsergebnisse aus dieser Reihe (III—VIII) sind nachstehend auch noch in graphischer Darstellung wiedergegeben.

Diagramm I zeigt die Zersetzung des Milchzuckers in Prozenten, Diagramm II die Bildung der Milchsäure in Centigrammen, berechnet für je 100 ccm Kulturflüssigkeit. Diagramm III endlich zeigt die Zu- und Abnahme der im Kubikcentimeter Peptonmolke gezählten Keime.

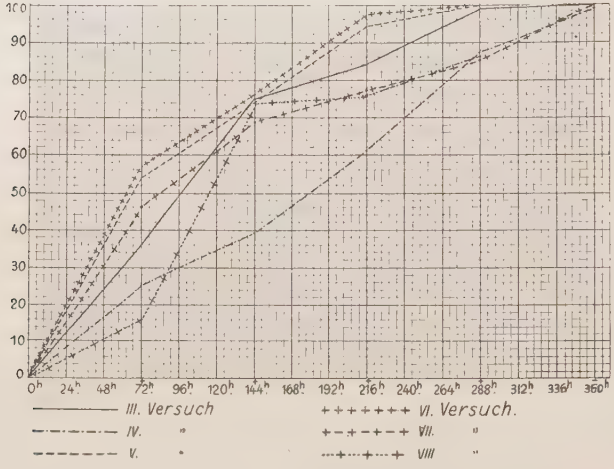
Wie man sieht, weichen die Kurven der Diagramme von einander im allgemeinen mehr oder weniger ab; es verhalten sich aber auch die Kurven der einzelnen Versuche auf dem gleichen Diagramm verschieden.

Was die Milchzuckerzersetzung anlangt, so dauert dieselbe allgemein an, bis der vorhandene Milchzucker zersetzt ist. Die Schnelligkeit des Anstiegs der Zersetzung war jedoch verschieden, am gröfsten bei den Versuchen V, VI und VII, im Verlauf derer

schon in den ersten drei Tagen etwa die Hälfte des Milchzuckers zerstört war. Bei Versuch IV war die Zersetzung durchaus verlangsamt; am Ende des dritten Versuchstages waren erst 25 %, am Ende des sechsten Versuchstages erst 40 % des vorhandenen

Diagramm I.

Zersetzung des Milchzuckers in Prozenten.



Milchzuckers zerlegt. In diesem Versuch erfolgte die Zersetzung aber aufserordentlich gleichmäfsig:

am	3.	Tage	zerlegt:	25 %
»	6.	»	»	39 % + 14
»	9.	»	»	54 % + 15
»	12.	»	»	85 % + 31
»	15.	»	»	100 % + 15

Verzögert war zu Anfang (bis zum dritten Tage) auch die Zersetzung des Milchzuckers in Versuch VIII (15 %); jedoch wuchs dieselbe innerhalb der nächsten drei Tage bereits auf 73 %.

Es liegt nahe, diese Unterschiede in der Milchzuckerzersetzung auf die Gröfse der Bakterienaussaat und -Vermehrung zurückzuführen. Im Versuch VIII ist in der That die Bakterienaussaat geringer gewesen als in irgend einem anderen Versuch. Nach drei Tagen waren die ausgesäten Bakterien zwar um das 50fache vermehrt, aber immerhin erst in der Hälfte der Menge vorhanden,

welche bei den meisten übrigen Versuchen schon gleich von vornherein vorhanden war. Am sechsten Tage allerdings war die Vermehrung auf das 10000fache gediehen. Eine solch rapide

Diagramm II.

Gebildete Milchsäure in Centigrammen pro 100 ccm Kulturflüssigkeit.

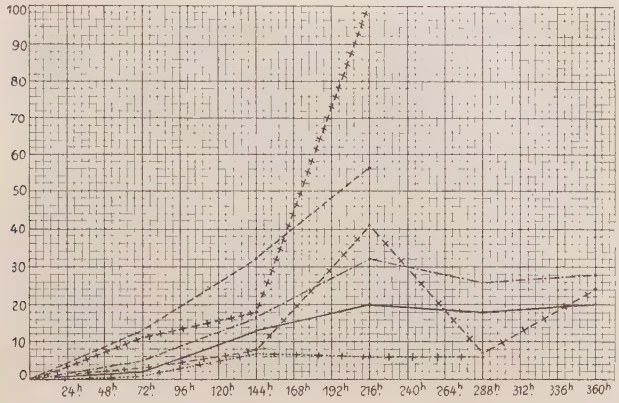
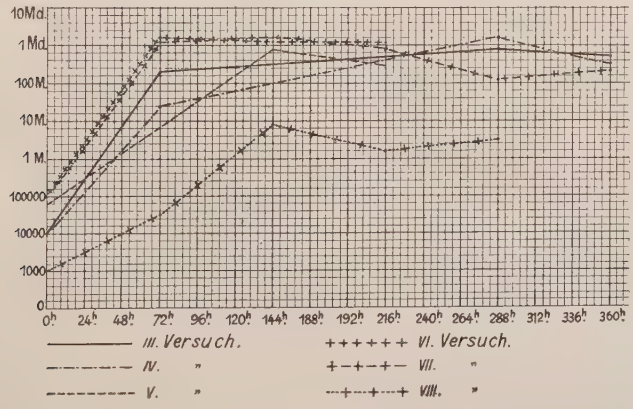


Diagramm III.

Vermehrung des Bac. acid. lact. Anzahl der Keime im Kubikcentimeter der Kulturflüssigkeit.



Vermehrung haben die Bakterien in den Versuchen VI und VII bereits in drei Tagen erfahren, während sie im Versuch IV erst am zwölften Tage erreicht war. Daher auch die verlangsamte Zersetzung des Milchzuckers in diesem Versuch.

Bemerkenswert ist, dafs die Bakterienvermehrung nicht fortwährend anhält, sondern relativ früh ihr Maximum erreicht; alsdann bleibt entweder die Bakterienzahl einige Zeit gleich oder sinkt sofort wieder ab, bis schliefslich die schon erwähnte Erscheinung auftritt, dafs auf den Zählplatten keine oder nur wenige Kolonien mehr zur Entwicklung kommen.

Die Ursache für dieses Verhalten der Bakterien könnte entweder die sein, dafs mit der drohenden Erschöpfung des Nährbodens die Vermehrung aufhört; dann müfsten aber immerhin noch zahlreiche Kolonien auf den Zählplatten zur Entwicklung gekommen sein; oder aber die Bakterien gehen infolge des Mangels an Nährmaterial oder durch Anhäufung der Stoffwechselprodukte zu Grunde, was, wie oben Seite 16 hervorgehoben ist, nicht der Fall war. Oder endlich, sie treten in ein Ruhestadium ein, ähnlich wie manche tierische Parasiten oder die Samen der Pflanzen, aus dem sie nur durch bestimmte Reize aufgeweckt werden. In diesem Falle müssen sie aber jedenfalls Reservestoffe aufspeichern (Fette, Kohlehydrate oder Eiweifsstoffe). Läfst man letztere Annahme gelten, so sind alle Schlüsse aus dem Ergebnisse der Auszählung der Plattenkulturen höchst wahrscheinlich falsch. Man zählt dann die noch nicht in das Ruhestadium eingetretenen, jedenfalls aber nicht alle in der Kultur vorhandenen Individuen. Es eröffnet sich hier noch ein weites Feld für die Forschung.

Auffällig stark weichen die Kurven für die Milchsäurebildung unter sich und von den oben behandelten Kurven für die Milchzuckerzersetzung und die Bakterienvermehrung ab. In den Versuchen III, IV und VIII bleibt die Milchsäureproduktion am sechsten, bezw. neunten Tage stehen, ja es geht sogar die Milchsäuremenge wieder zurück. Der starke Rückgang der Milchsäureproduktion am zwölften Tage des Versuches VII kann vielleicht durch einen Analysenfehler bedingt sein. Hingegen steigt die Milchsäuremenge in den Versuchen V und VI konstant an, im Versuch VI sogar vom sechsten Tage an überraschend schnell.

Von vornherein sollte man erwarten, dafs die Milchsäuremengen den zersetzten Milchzuckermengen parallel gehen würden;

das ist aber fast bei keinem Versuche nachzuweisen gewesen. Der Bakterienvermehrung geht die Milchsäureproduktion auch nur im Versuch VIII parallel; bei allen anderen Versuchen läfst sich gar keine Übereinstimmung im Gang der Milchzuckerzersetzung und Milchsäurebildung auffinden. Schon dieser Umstand spricht meines Erachtens dafür, dafs die Milchsäurebildung der Bakterien kein einfacher molekularer Spaltungsvorgang ist, etwa wie der der Spaltung der Zuckerarten in Alkohol und Kohlensäure durch die Zellthätigkeit der Hefe.

Bei den sämtlichen vorstehenden Versuchen III—VIII ist aufserdem auffällig, dafs die Menge der gebildeten Milchsäure so aufserordentlich gering ist im Verhältnis zum zerstörten Milchzucker. Rechnet man, welche Mengen Milchsäure hätten gebildet werden können, wenn aller Milchzucker in Milchsäure zerlegt worden wäre, so erhält man folgende Werte, die nachstehend übersichtlich geordnet nach den sechs Versuchen mitgeteilt sind:

Versuch	Verhältnis der gefundenen zu der erwarteten Milchsäure in %		
	nach 72 h	144 h	216 h
III	1,5	5,0	7,0
IV	5,6	12,0	15,0
V	8,0	13,0	18,0
VI	6,0	8,0	33,0
VII	1,2	4,0	17,0
VIII	4,5	3,0	2,0

Nur in einem Falle ist $^1/_3$ der theoretischen Milchsäuremenge gebildet, in den meisten Fällen nur $^1/_7$ bis $^1/_6$.

Bei der Bestimmung des Keimgehaltes im Verlaufe der Versuche III—VIII ist mir wiederholt aufgefallen, dafs die Auszählungen der verschiedenen Kontrollplatten weniger gut übereinstimmende Resultate lieferten als die bei den Versuchen I und II. Ich glaube nicht irre zu gehen, wenn ich annehme, dafs dies dadurch bedingt war, dafs der verhältnismäfsig schwere, rasch sedimentierende kohlensaure Kalk einen Teil der Bakterien mechanisch niederrifs, während die Probe zur Aussaat aus dem

allerdings gut umgeschüttelten Kölbchen mit der ausgeblasenen Portion entnommen wurde.

Ich habe daher bei dem nächsten Versuche statt des gefällten Calciumkarbonats Marmorstückchen verwendet. Die Befürchtung, dafs Marmor als krystallinisches Calciumkarbonat vielleicht zu hart sei, um die abgespaltene Milchsäure schnell genug zu binden, und so etwa nachteilig auf die Vermehrung und Lebensthätigkeit der Bakterien einwirken könnte, erwies sich als unbegründet. Von den nach Beendigung des Versuches herausgenommenen Stücken Marmor liefsen sich schon mit den Fingern leicht gröfsere Krümmel abreiben; die ganzen Stücke waren so mürbe geworden, dafs ich sie leicht zerbrechen konnte.

Der Versuch IX verlief im übrigen ebenso wie die vorhergehenden, nur waren die Resultate der Auszählungen thatsächlich besser übereinstimmend. Ich lasse das Versuchsergebnis nachstehend folgen.

IX. Versuch.

500 ccm 1 proz. Peptonmolke mit Marmorstückchen, geimpft mit einer frischen Bouillonkultur von Bacillus acid. lact. Hueppe.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kulturflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,194	—	—	—
» 72 Stunden	3,090	0,104	0,009	101 101
» 144 »	2,832	0,258	0,019	17 586 524
» 216 »	1,076	1,756	0,093	539 173 855
» 288 »	0,359	0,717	0,056	89 049 630
» 360 »	Spuren	0,359	0,009	28 501 594

Eine kleine Abweichung zeigt das Resultat dieses Versuches allerdings darin, dafs sowohl Milchzuckerzersetzung wie Bakterienvermehrung anfänglich mehr verzögert waren. Ich halte es für möglich, dafs diese Verzögerung durch die etwas schwerere Angreifbarkeit des Marmors, bezw. die durch ihn gebotene kleinere Angriffsfläche bedingt war. Es kann hierdurch möglicherweise anfänglich doch eine gewisse hemmende Säuerung im Nährboden zustande gekommen sein.

Ich habe deshalb zu den folgenden beiden Versuchen (X und XI) Austernschalen verwendet. Die Austernschalen waren in der Weise präpariert, dafs die zertrümmerten Schalen in einem Gefäfs mit Wasser drei Stunden bei zwei Atmosphären Druck im Autoclaven zur Entfernung der organischen Substanz erhitzt wurden. Eine Analyse der Austernschalen ergab 0,38 % Magnesiumoxyd, Spuren von Eisen und Phosphorsäure; der Rest war kohlensaurer Kalk.

X. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kulturflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,194	—	—	9 191
» 72 Stunden	Spuren	fast 3,194	0,112	unzählbar
» 144 »	—	—	0,028	unzählbar

Da der Versuch X wider alles Erwarten nach 72 Stunden schon beendet war, wurde zur Kontrolle ein zweiter Versuch angestellt.

XI. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kulturflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,328	—	—	101
» 24 Stunden	2,268	1,060	0,019	601 859
» 48 »	Spuren	2,268	0,130	2 638 928

Das Resultat dieser beiden Versuche war ungemein überraschend. Während in früheren Versuchen der Milchzucker frühestens nach 216 Stunden verschwunden war, waren beim Versuch XI schon nach 48 Stunden nur noch Spuren Zucker nachzuweisen.

Da die Versuchsbedingungen bis auf das Neutralisierungsmittel die gleichen geblieben waren, so konnte der Grund zu dieser auffälligen Erscheinung nur in ihm gesucht werden.

Dem geringen Eisengehalt kann die so energische Wirkung nicht zugeschrieben werden, da Bakterien im allgemeinen auf Eisengehalt des Nährbodens keinen Anspruch erheben.

Da der Gehalt an Phosphorsäure in den Austernschalen ein nur sehr geringer ist, Molke anderseits Phosphate in gröfserer Menge enthält, so ist der Ausfall der beiden letzten Versuche vielleicht der Magnesia zuzuschreiben, eine Vermutung, die mit den bisherigen Erfahrungen über die Wirkung des Magnesiagehaltes des Bodens auf höhere Pflanzen auch ganz gut im Einklang stehen würde.

Ich habe deshalb einen Versuch in der gewohnten Weise angestellt, statt der Austernschalen aber Marmor genommen und soviel Magnesiumkarbonat hinzugefügt, als einem Gehalt von 0,38 % Magnesiumoxyd der Austernschalen entsprach.

Meine Hoffnung, hierdurch die gewünschte Aufklärung zu erhalten, wurde getäuscht. Die drei Tage im Brutschrank bei 37° gehaltene Molke hatte nicht die geringste Abnahme in ihrem Milchzuckergehalt erfahren; in einem zweiten Versuche, der fünf Tage währte und bei dem wieder Austernschalen verwendet wurden, konnte nur eine Abnahme von 0,29 % Milchzucker festgestellt werden.

Welcher Umstand die Erscheinung der rapiden Zerlegung des ganzen Milchzuckers bei den Versuchen X und XI veranlafst hat, ist einstweilen unklar. In einem aber stimmen auch diese Versuche mit den vorhergehenden überein: in der verhältnismäfsig sehr geringen Milchsäurebildung:

Versuch	Verhältnis der gefundenen zur erwarteten Milchsäure in %		
	nach 24 h	48 h	72 h
X	—	—	3,6
XI	1,7	5,4	—

Der Theorie nach soll bei der Milchsäuregärung ein Molekül Milchzucker in vier Moleküle Milchsäure zerfallen:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 4\,C_3H_6O_3.$$

Dafs die Umsetzung nicht glatt im Sinne dieser Gleichung verläuft, war schon lange bekannt. Man weifs ja auch, dafs Rohrzucker bei der Alkoholgärung nicht glatt in Alkohol und Kohlensäure zerfällt, vielmehr ein, wenn auch sehr geringer Teil des Zuckers zur Ernährung der betreffenden Hefeart verbraucht wird. Die Menge des erzeugten Glycerins und der Bernsteinsäure, die als Nebenprodukte entstehen, pflegt aber 3,6 % resp. 0,7 % [1]) nicht zu überschreiten.

Es wäre also auch nicht besonders auffällig gewesen, wenn bei der Zersetzung des Milchzuckers durch den Bacillus acidi lactici Hueppe Nebenprodukte in nur geringer Menge aufgetreten wären. Nun aber ergab die Untersuchung auf Nebenprodukte, die mit dem Rest der Kulturflüssigkeit des Versuches IX nach Beendigung der Gärung angestellt war, einen auffallend hohen Prozentsatz von Alkohol [2]), nämlich 0,9 %. Weiter war oben festgestellt, dafs sich sowohl im Gelatinestich wie in Bouillonkulturen Gasbläschen entwickelten, die Hueppe als aus Kohlensäure bestehend erkannte. Meine schon mitgeteilten Untersuchungen haben ebenso wie die früherer Untersucher Essigsäure als Nebenprodukt ergeben. Sodann machte sich bei einzelnen meiner Versuche (III, IV, VII, VIII und X) nach 216 resp. 288 Stunden eine Verringerung der zuerst gebildeten Milchsäure bemerkbar.

Diese Erfahrungen liefsen die Vermutung zu, dafs der Bacillus acidi lactici Hueppe aufser einem Abbau des Milchzuckermoleküls in Milchsäure noch eine Zerlegung der Milchsäure in Alkohol und Kohlensäure bewirke, im Sinne der chemischen Gleichung:

$$C_3H_6O_3 = C_2H_6O + CO_2,$$

und dafs die Essigsäure vielleicht durch Oxydation des Alkohols gebildet würde, analog dem Vorgang bei der Essigbildung.

Oder es war auch denkbar, dafs durch die Anhäufung von Kohlensäure Sauerstoffmangel in den Kulturflüssigkeiten eintrat,

---

1) Flügge, Die Mikroorganismen, 1896, Bd. I, S. 226.

2) Scholl, Die Milch, Wiesbaden 1891, bestreitet zwar, dafs der Bacillus acidi lactici Hueppe Alkohol produziere, doch findet in den Lehrbüchern, z. B. Flügge, stets die Produktion von Alkohol Erwähnung.

der die Bakterien zwang, Essigsäure als abnormes Produkt zu bilden.[1])

Eine Durchlüftung des Versuchskolbens konnte hier vielleicht Klarheit schaffen.

Der Versuch wurde in folgender Weise ausgeführt: Ein Kolben mit 400 ccm 1proz. Peptonmolke mit Marmorstückchen, beschickt mit einer frischen Traubenzuckerbouillonkultur des Bacillus acidi lactici, wurde im Brutschrank bei 37° einer Durchlüftung unterzogen.

Zu diesem Zwecke wurde der Kolben mit einer Saugpumpe verbunden; zwischen ihm und der Pumpe waren eingeschaltet: eine Wulfsche Flasche (um etwa zurücksteigendes Wasser aufzufangen), zwei mit je 200 ccm von etwa $^1/_{10}$ N-Barytwasser gefüllte Pettenkofersche Barytröhren und wieder eine Wulfsche Flasche zur Kondensation des aus dem Versuchskolben weggeführten Wasserdampfes. Anderseits stand der Kolben (rückwärts) in Verbindung mit einem sterilisierten Filter aus Baumwolle und mit einer mit Wasser beschickten Waschflasche, um den Durchlüftungsstrom mit Wasserdampf zu sättigen, die sich ebenfalls im Brutschrank befand. An diese schlossen sich zwei Absorptionstürme, in denen sich mit Wasser befeuchteter Bimsstein befand, sowie einer, der mit Natronlauge getränkte Bimssteinstücke enthielt, und endlich eine Waschflasche mit Natronlauge, um die Kohlensäure der Luft zu absorbieren.

Die Saugpumpe wurde nur soweit in Thätigkeit gesetzt, dafs die Luft langsam in kleinen Blasen durch die Barytröhren trat. Alle 24 Stunden wurde der Inhalt der Barytröhren in Stöpselflaschen abgefüllt und durch frisches Barytwasser ersetzt. Von dem Inhalt der Stöpselflaschen wurden nach dem Absitzen des Baryumkarbonats je 25 ccm entnommen und mit $^1/_{10}$ N-Oxalsäurelösung titriert. Die Vermehrung der Bakterien, die Abnahme des Milchzuckers und die Menge der Milchsäure wurde wie bei allen anderen Versuchen jeden dritten Tag festgestellt.

---

1) Barthel, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, Abt. II, Bd. VI, S. 417, kommt zu dem Resultat, dafs sich die Menge der Essigsäure bei Durchlüftung wie 3 : 2 (bei Nichtdurchlüftung) verhalte.

Nach Beendigung des Versuches wurde eine quantitative Bestimmung des Gesamtcalciums des Kolbeninhalts vorgenommen und damit die Menge der erhaltenen Kohlensäure verglichen.

Das Ergebnis dieses Durchlüftungsversuches sei in nachstehender Tabelle aufgeführt.

XII. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure in %	Keime pro 1 ccm	Kohlensäure in g	Kohlensäure in je 3 Tagen
Nach d. Beschickg.	3,328	—	—	20 020	—	
» 24 Stunden	—	—	—	—	0,6635	
» 48 »	—	—	—	—	0,4026	2,0493
» 72 »	1,342	1,986	0,074	170 340 170	0,9832	
» 96 »	—	—	—	—	0,3452	
» 120 »	—	—	—	—	0,1623	0,7812
» 144 »	0,976	0,366	0,056	17 547 530	0,2737	
» 168 »	—	—	—	—	0,2129	
192 »	—	—	—	—	0,2572	0,6188
» 216 »	0,909	0,067	0,037	15 045 030	0,1487	
» 240 »	—	—	—	—	0,2275	
» 264 »	—	—	—	—	0,0638	0,3764
» 288 »	0,857	0,052	0,018	5 045 040	0,0851	
» 312 »	—	—	—	—	0,0251	
» 336 »	—	—	—	—	0,0286	0,0609
» 360 »	—	—	—	—	0,0072	
384 »	0	0,857	0,052	?	0,0000	

Der Versuch wurde abgebrochen, als keine Kohlensäure mehr entwickelt wurde. Die Kulturflüssigkeit war fast ganz klar geworden. Sie wurde nach der auf Seite 13 angegebenen Methode behandelt; der Rückstand wurde nach dem Abdampfen eingeäschert, und das rückständige schwefelsaure Calcium mit Soda geschmolzen. Nach dem Auslaugen und Auswaschen der löslichen Salze wurde das Karbonat in verdünnter Salzsäure gelöst, das Calcium als Oxalat gefällt und als Oxyd gewogen: gefunden wurden 0,334 g Calciumoxyd.

Versuch XII ergab . . . . . 3,8866 g Kohlensäure
0,334 g Calciumoxyd entsprechen 0,2620 g »
so dafs 3,6246 g Kohlensäure

aus zerlegtem Zucker oder anderen Nahrungsstoffen herstammen müssen.

Daneben wurde durch Destillation der mit Schwefelsäure angesäuerten Kulturflüssigkeit 0,162 % Essigsäure gefunden. Der Milchsäuregehalt betrug 0,052 %.

Hieraus ergibt sich folgendes:

Wegen des Zusatzes von Marmor mufs alle gebildete Säure in Form von Calciumsalz vorhanden gewesen sein, da die Peptonmolke vorher eben schwach alkalisch war.

Gefunden wurden direkt	0,334 g CaO
ferner 0,162 % Essigsäure, also für 320 ccm[1]) Molke 0,518 g, entsprechend	0,242 g CaO
und 0,052 % Milchsäure, also für 320 ccm Molke 0,166 g, entsprechend	0,052 g CaO
zusammen:	0,294 g CaO.

Durch Analyse gefunden	0,334 g Calciumoxyd
berechnet	0,294 g »
somit mehr gefunden als berechnet	0,040 g Calciumoxyd,

welche wohl auf den ursprünglichen Kalkgehalt der Molke zurückgeführt werden müssen.

Durch die gefundenen 3,6246 g Kohlensäure, die nicht aus zersetztem Marmor herrühren können, wird aber der Verbleib des Milchzuckers lange nicht aufgeklärt. Nimmt man für die Berechnung der zu erwartenden Kohlensäure selbst die Endgleichung:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + O_{24} = 12\,CO_2 + 11\,H_2O,$$

so würde die gefundene Kohlensäure immer erst 2,3477 g Milchzucker entsprechen.

Allerdings kommt noch die Produktion von Alkohol in Betracht, aber auch dessen Menge reicht nicht hin, den Verbleib des Zuckers völlig aufzuklären.

Den Anlafs zu diesem Versuche hatte die Erwägung gegeben, ob etwa die Milchsäure weiter gespalten würde, und jene, ob die Zunahme der Kohlensäure in der Kulturflüssigkeit hemmend auf die Milchsäurebildung wirke.

1) 320 ccm Kulturflüssigkeit waren bei Beendigung des Versuches noch vorhanden.

Was die erstere Frage anlangt, so gibt der Ausfall des Versuches XII wohl die klare Antwort, dafs die Milchsäure durch die Bakterien weiter zerlegt wird. Würde nur einfach ihre Bildung gehemmt sein, so müfste der Gehalt der Flüssigkeit an Milchsäure zwar langsam ansteigen, aber jedenfalls an sich sehr gering sein. Gerade das Gegenteil findet aber statt. Nachdem zunächst eine gewisse Menge Milchsäure gebildet ist, nimmt deren Menge von Tag zu Tag ab und steigt erst wieder kurz vor Abschlufs des Versuches an, zu einer Zeit, wo der Milchzucker zum gröfsten Teil bereits zerlegt ist.

Hingegen läfst sich nicht darthun, dafs die Gegenwart von Kohlensäure in der Kulturflüssigkeit auf die Bildung von Milchsäure von nachteiligem Einfluſs ist. In dem Durchlüftungsversuche wurden in den ersten drei Tagen aus 1,986 g Milchzucker 0,074 g Milchsäure gebildet, während in der gleichen Zeit in den übrigen Versuchen ohne Abführung der Kohlensäure gebildet wurden:

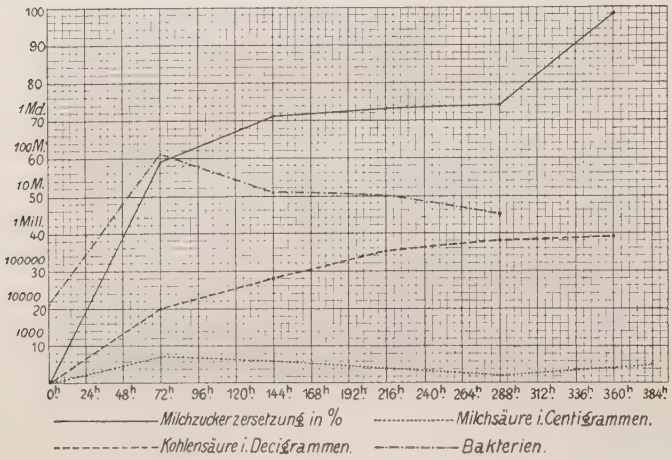
Versuch	Zerstörter Milchzucker	Gebildete Milchsäure	Auf 100 g Milchzucker entfallen Milchsäure
III	1,240	0,018	1,45
IV	0,998	0,056	5,61
V	1,702	0,130	7,64
VI	1,806	0,112	6,20
VII	1,470	0,018	1,23
VIII	0,422	0,018	4,26
IX	0,104	0,009	8,65
X	3,194	0,112	3,51
XI	1,060	0,019	1,80
XII	1,986	0,074	3,73

Das Gesamtergebnis des XII. Versuches habe ich auf nachfolgender graphischer Darstellung wiedergegeben. Aus derselben wird ersichtlich, dafs Milchzuckerzersetzung, Milchsäurebildung und Kohlensäureproduktion anfänglich mit einer rapiden Vermehrung der Milchsäurebakterien zusammengehen. Mit der Abnahme der Bakterien nimmt relativ alles wieder ab: Während

aber absolut die Menge der Kohlensäure und des zerstörten Milchzuckers noch wächst, nimmt die Milchsäure auch absolut an Menge ab.

Es könnte nun noch der Einwand erhoben werden, dafs sämtliche Versuche bei zu hohen Temperaturen ausgeführt seien, bei welchen die Umsetzung des Milchzuckers aus thermochemischen Gründen leichter zu Essigsäure, Alkohol und Kohlensäure erfolgen könnte; aber auch diesen Einwand entkräftet der Befund

Diagramm des Versuches XII.



bei einem Versuche bei 17°, im Verlaufe dessen nach 12 Tagen auch nicht mehr Milchsäure (0,018%) gebildet war.

Ich glaube, dafs zur Aufklärung der Widersprüche in den Versuchsergebnissen besondere Versuche nötig sind, die namentlich das Verhalten der Milchsäurebakterien in Kulturflüssigkeiten festzustellen bezwecken müfsten, welche beliebig in ihrer Zusammensetzung modifiziert werden. Ich glaube dies um so mehr, als ja auch Burchard bei seinen Versuchen mit Zusatz von schwefelsaurem Kalk zum Harn ganz andere Resultate erzielte als bei den Versuchen ohne diesen Zusatz. Zweifellos stellen gewisse Zusätze zu den Kulturflüssigkeiten Reize für die Bakterien dar, unter deren Wirkung die Stoffzersetzung rascher, intensiver und andersartig werden kann.

Mir genügt zunächst das Ergebnis, dafs der Milchzucker nicht blofs in Milchsäure, sondern in eine ganze Reihe von anderen Stoffen zerlegt wird, und dafs bei Bindung der Milchsäure durch Kalk die Zersetzung des Milchzuckers eine ganz aufserordentlich grofse ist.

Um über die Leistung der einzelnen Bakterienzelle einen Überblick zu gewinnen, füge ich folgende Tabelle bei:

Versuch	Anzahl der Keime pro Kubikcentimeter		Milchzuckerzersetzung in 72 Std. in mg
	bei Beginn	nach 72 Std.	
III	10 010	300 600 300	12,40
IV	10 010	40 080 040	9,98
VI	200 100	2 649 203 440	18,06
VII	200 100	2 283 280 825	14,70
VIII	1 001	51 005	4,22
XII	20 020	170 340 170	19,86

Daraus leitet sich folgende quantitative Stoffzersetzung der Milchsäurebakterien ab:

Versuch	Mittlere geometrische Keimzahl während 72 Std.	Milchzuckerzersetzung in 72 Stunden in mg	Zersetzung durch 1000 Keime in 72 Std. in mg	Zersetzung durch 1000 Keime pro Stunde in mg	Mittlere Teilungszeit eines Keimes in Stunden
III	1 734 650	12,40	0,0071	0,00010	4,9
IV	633 404	9,98	0,0158	0,00022	6,1
VI	23 028 400	18,06	0,0008	0,00001	5,3
VII	21 374 900	14,70	0,0007	0,00001	5,4
VIII	7 145	4,22	0,6029	0,00838	12,6
XII	1 846 675	19,86	0,0107	0,00015	5,8

Die mittlere Zersetzungsgröfse für 1000 Keime schwankte nicht unerheblich, nämlich zwischen $^1/_{100\,000}$ bis $^8/_{1000}$ mg für die Stunde.

Als Mittel für die Teilungszeit eines Keimes ergeben sich 5,5 Stunden, wenn von Versuch VIII abgesehen wird, bei dem ganz abnorme Verhältnisse vorzuliegen scheinen.

Burchard beobachtete bei dem Micrococcus ureae liquefaciens die Erscheinung, dafs, je schneller die Teilung eines

Keimes erfolgte, desto langsamer der Harnstoff zersetzt wurde. Ich kann die gleiche Erscheinung für den Bacillus acidi lactici Hueppe nachweisen.

Da es mir gelang, auf Traubenzucker-Gelatine rasch sehr üppige Kulturen des Bacillus acidi lactici zu erzielen, so habe ich versucht, das Gewicht meiner Bakterien festzustellen.

Den Versuch habe ich folgendermafsen angestellt: Die Kulturrasen wurden möglichst vorsichtig mit der Platinöse von der Gelatineplatte abgekratzt und in einem sterilen Wägegläschen gewogen. Eine gewogene Menge wurde dann durch Schütteln mit Glasperlen gut in Wasser verteilt; von dieser wässerigen Suspension der Bakterien wurden Verdünnungen hergestellt, Platten gegossen und ausgezählt. Die Berechnung ergab:

17 767 750 000 Bakterien für ein Gramm feuchter Bakterienmasse.[1])

Der Rest der Bakterienmasse wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ergab:

10,12 % Trockensubstanz,
89,88 % Wasser.

Wie oben aus der Tabelle ersichtlich, zersetzten 1000 Keime in der Stunde 0,00001 bis 0,00838 mg Milchzucker. Die stündliche Leistung eines Gramms feuchter Bakterienmasse bei der Zerlegung des Milchzuckers würde sich also auf 178 bis 14 889 g Milchzucker beziffern.

1) Nägeli, Die niederen Pilze, München 1877, S. 7, hat für einen ganz kleinen Coccus berechnet, dafs im trockenen Zustand 30 Billionen Spaltpilze auf 1 g entfallen; bei einem durchschnittlichen Wassergehalt der Spaltpilzzellen von 80 % würden etwa 6 Billionen Spaltpilze im feuchten Zustand auf 1 g kommen. Allerdings ist der Bacillus acidi lactici erheblich gröfser als die von Nägeli verwendete Coccenart.